

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-121908

(43)Date of publication of application : 09.05.1990

(51)Int.Cl.

A61K 7/00
A61K 39/40

(21)Application number : 63-274312

(71)Applicant : KANEBO LTD
GEN CORP:KK

(22)Date of filing : 28.10.1988

(72)Inventor : MIYAMOTO TATSU
UCHIDA RYOICHI
TOUHO ASAMI
OGAWA TADATAKE
TOKORO TORU
KODAMA YOSHIKATSU
YOKOYAMA HIDEAKI

(54) COSMETIC FOR PIMPLE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a cosmetic containing an egg yolk antibody prepared from an egg of hen having immunized lipase produced outside bacterium cell by Propionibacterium acness, free from skin stimulation, having long-term storage stability and effective to prevention and remedy for pimple.

CONSTITUTION: The aimed cosmetic for pimple containing 0.0001-0.5wt.% egg yolk antibody obtained from hen egg having immunized lipase produced outside bacterium cell by Propionibacterium acness which is a bacterium always existing in a skin. The above-mentioned egg yolk antibody is obtained from an egg produced by a hen treated by concentrating and recovering a lipase from culture filtrate obtained by anaerobically culturing Propionibacterium acness in a liquid medium at 37° C for 3-10 day by operation of ammonium sulfate precipitation and applying the lipase to a domestic fowl such as white leghorn by hypodermic injection, instillation, etc. The title cosmetic is further blended with horny dissolving material, bactericidal substance, etc., and used in form of lotion, emulsion, cream, stick like material, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection] "

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-121908

⑮ Int. Cl.⁵

A 61 K 7/00

39/40

識別記号

Y
K

庁内整理番号

7306-4C
7306-4C
8829-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)5月9日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全8頁)

⑬ 発明の名称 にきび用化粧料

⑰ 特 願 昭63-274312

⑱ 出 願 昭63(1988)10月28日

⑲ 発 明 者	宮 本	達	神奈川県茅ヶ崎市高田3丁目10番12号
⑲ 発 明 者	内 田	良 一	神奈川県平塚市桃浜町24番12号
⑲ 発 明 者	東 保	麻 美	神奈川県茅ヶ崎市東海岸南6丁目2番26号 シーサイドコーポ201号
⑲ 発 明 者	小 川	忠 文	神奈川県小田原市蓮正寺470番の208
⑲ 発 明 者	所	透	岐阜県不破郡垂井町岩手1052番地
⑲ 発 明 者	児 玉	義 勝	岐阜県岐阜市御望951-201
⑲ 発 明 者	横 山	英 明	岐阜県各務原市蘇原宮代町2丁目115番地の2
⑲ 出 願 人	鐘 紡 株 式 会 社		東京都墨田区墨田5丁目17番4号
⑲ 出 願 人	株式会社ゲン・コーポレーション		岐阜県岐阜市折立296番地1

明 細 書

1. 発明の名称

にきび用化粧料

2. 特許請求の範囲

皮膚の常在菌であるプロピオニバクテリウム・アクネスが菌体外に産生するリパーゼを免疫した鶏が産生する卵より調製された卵黄抗体を含有することを特徴とするにきび用化粧料。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、プロピオニバクテリウム・アクネス(以下P・アクネスと略記する)が菌体外に産生するリパーゼを免疫した鶏の卵より調製された卵黄抗体を含有することを特徴とする新規なにきび用化粧料に関する。

(従来の技術及び発明が解決しようとする課題)

にきびは、皮膚の体裁を醜くし、かつしばしば厄介な症状を伴い、皮脂腺に富む皮膚の成る領域、特に顔、頸、背に発生する。にきびの発生原因は、主として、①皮脂の過剰な分泌、②毛包脂腺系排

出管の閉塞、③毛包脂腺管内のプロピオニバクテリウム属の細菌(主としてP・アクネス)の存在などである。これらの発生因子によって、特徴的なにきびの面皰、丘疹、膿疱等の症状が現れる。

現在、主流を占めているにきびの予防法、処置法或いは治療法は、①過剰な皮脂の分泌を抑制すること、②毛包の閉塞を除去すること、③細菌の増殖を抑制し、更には殺菌処理を施すこと、④炎症作用を抑制すること等が挙げられる。

抗体を応用した組成物としては、抗体及びこれを有効成分とするスプレー剤(特開昭62-175426)、トリないしウシ抗体を用いた哺乳動物の受動免疫化方法及びそのための組成物(特開昭60-248628)があるが、単に細菌単独をニワトリ等の鳥類やウシ等の哺乳類に免疫しても、得られる抗体の細菌に対する制菌効果等の直接的な効果は期待出来ず、P・アクネス等により生ずるにきびの炎症には必ずしも効果的ではないのが現状である。

本発明は、皮膚刺激性が無く、にきびの治療に

特開平2-121908 (2)

有効なる作用を有する全く新しいにきび用化粧料を提供することを目的としている。

(課題を解決するための手段)

本発明は、皮膚の常在菌であるプロピオニバクテリウム・アクネスが菌体外に産生するリバーゼを免疫した鶏が産生する卵より調製された卵黄抗体を含有することを特徴とするにきび用化粧料である。

本発明に係る卵黄抗体は、P. アクネスが菌体外に産生するリバーゼを免疫した鶏が産生する卵より容易に調製される。

ここで、本発明に使用するP. アクネスは、通常の嫌気性菌の培養に使用されるブレイン・ハート・インフュージョン培地(BHI培地)などの液体培地を用い、嫌氣的に37℃で3~10日間培養することで培養を行い、遠心分離することにより容易に得られる。

P. アクネスが菌体外に産生するリバーゼは、P. アクネスの培養濾液より、硫酸アンモニウム沈澱、アルコール沈澱、限外濾過等の操作により

濃縮、回収される。このリバーゼ成分は更に、セファデックスG-100等によるカラムクロマトグラフィーを行い、リバーゼ活性を示す分画を集めることで精製が可能である。得られたリバーゼは、集めて蒸留水に対して透析を行い、凍結乾燥により保存が可能である。また、そのまま凍結保存することも可能である。

免疫操作に用いる鶏としては、特に制限はないが、抗体の生産性という点からは、白色レグホンなどの卵用種を用いるとよい。

また、免疫方法としては、皮下注射、腹腔内注射、筋肉注射などによる通常の方法や、点鼻、点眼などの方法によって行うことができる。

更に、抗原の投与量は、所望の抗体価が得られ、かつ鶏に対して悪影響を与えない量を適宜選択して用いればよい。また、必要に応じて完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントなどのアジュバントと併用してもよい。

免疫後に、約2週間の間隔で抗体価をエンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ等の方

法により測定し、推移を追跡する。通常、初回免疫から数週間後投与抗原に対して特異的に反応する抗体が卵(卵黄)中に得られるが、通常約3ヶ月間で抗体としての効果を発揮するのに充分な高い抗体価をもつ抗体が得られる。なお、免疫後、抗体価の減少が認められる場合、適当な間隔で適宜追加免疫することにより抗体価を高めることができる。

本発明に係る卵黄抗体は、この、免疫した鶏が産生する卵の卵黄より、クロロホルムを添加し、攪とう、攪拌、遠心分離を行うことにより脂質を除去した後の上清の水溶液より得られ、蒸留水に対して透析後、濾過滅菌、凍結乾燥等の操作により保存が可能である。得られた卵黄抗体は白色から淡黄色を呈し、主として免疫グロブリン(γ-リベチン)からなるタンパク質成分であるが、その他β-, α-リベチン、オボアルブミンなどのタンパク質成分も含有している。

本発明に係る卵黄抗体は、未精製の状態で使用することができるが、卵黄中に含まれる免疫グ

ロブリンを抽出・分離することによって更に高い抗体価が得られる。抽出・分離方法としては、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等の塩類、またはデキストラン硫酸やポリエチレングリコール等の高分子化合物を用いた沈澱法や、DEAEセルロース等を用いるイオン交換クロマトグラフィーやセファロース類、セファデックス類等のゲル濾過剤を用いるゲル濾過クロマトグラフィー等によっても更に精製が可能である。その他、通常用いられている免疫グロブリンを抽出・分離できる各種の方法等が利用できる。

本分画は、水溶性であり、最高で10重量%迄溶解可能である。その他アルコールを含む水溶液にも溶解が可能である。

本発明に係る卵黄抗体のP. アクネスに対する作用メカニズムは次の如く考えられる。P. アクネスが菌体外に産生するリバーゼをニフトリに免疫して得られる卵黄抗体は、P. アクネスが産生するリバーゼの活性を特異的に阻害する。従って、リバーゼの反応により生ずる遊離脂肪酸の発

特開平2-121908(3)

生を抑制し、菌の増殖、皮膚内での炎症反応、角質化等の抑制を行なうことにより、優れたにきび治療効果を発揮するものと推察される。

本発明に係る卵黄抗体の配合量はにきび用化粧料（組成物）の総量を基準として大略0.0001～0.5重量%（以下w.t.%と略記する）の範囲である。ここで、卵黄抗体の配合量は、0.0001w.t.%未満では効果が十分に達成されず、0.5w.t.%を超えてもその増加分に見合った効果の向上は望めない。

更に、本発明のニキビ化粧料は、通常使用される角質溶解作用を有する成分として、レゾルシン、イオウ、サリチル酸、尿素、イソプロピルメチルフェノール等、殺菌作用を有する成分として、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンザトニウム、その他の成分として、グリチルリチン、グリチルレチン酸、アラントイン、酸化亜鉛、硫酸亜鉛、乳酸アルミニウム、乳酸エチル、エストラジオール、カンフル、ビオチン等を同時に配合する

ことも可能であり、その場合、より一層効果の増強が期待できる。また、その他の添加剤である抗酸化剤、香料、色素、各種ビタミン類等を本発明の目的を達成する範囲で適宜調整し配合することが可能である。

本発明のにきび化粧料は、ローション類、乳液類、クリーム類、ゲル状物、スティック状物等の剤型に通常の方法により調整することが可能である。

（実施例）

以下、実施例、比較例の記載に基づいて本発明を詳説する。実施例に記載したヒト皮膚貼付試験、にきびの治療効果試験は下記の通りである。

(1) ヒト皮膚貼付試験

被験者25名の前腕屈側部皮膚に、試料0.05gを直径1.0cmの円形のろ紙のついた貼付試験用絆創膏を用いて24時間の閉塞貼付を行った。次いで、下記第1表の判定基準に従って、絆創膏除去1時間後、24時間後の判定を実施した。判定結果は、反応の強い方の評価を採用し、被験者

25名のうち評価が（±）以上と判定された人の数で示した。

第 1 表

判 定 基 準	評 価
紅斑、浮腫、水疱	(++)
紅斑、浮腫	(+)
軽微な紅斑	(±)
無紅斑、無浮腫	(-)

(2) にきび治療効果試験

顔面がにきび症状を有する被験者の左部に対照品（基剤のみの組成物）を、右部には実施例或いは比較例の試験品を各々1日に朝夕2回ずつ1ヶ月間連続塗布した。次いで、にきび疾患部の治療効果を下記第2表の判定基準に従って、半顔比較法により判定した。判定結果は、評価点の平均値で示した。

第 2 表

判 定 基 準	評 価 点
試験品は対照品と比較して	
・完全に治癒	5
・明らかに改善している	4
・改善している	3
・僅かに改善している	2
・変化なし（差が無い）	1

（卵黄抗体の調製）

実施例、比較例に係るP. アクネス及びP. アクネスが菌体外に産生するリパーゼの調製、鶏に対する免疫、卵黄抗体の調製の例を示す。

1. P. アクネスの菌体の調製

G. バブロらの方法（ジャーナル・オブインベスティゲイティブ・デルマトロジー、63巻、231-238頁、1974年）に従って、BH1液体培地（ディフコ社製、5ℓ）を用いて、P.

特開平2-121908 (4)

アクネスを嫌氣的に37℃で5日間培養し、遠心分離により菌体を培養上清と分離した(菌体湿重量: 8.5g)。

2. P. アクネスが菌体外に産生するリバーゼの調製

次に、G・パブロらの方法によりP. アクネスが菌体外に産生するリバーゼの調製を行った。前記したP. アクネスの培養上清50mlを-4℃に冷却し、-10℃に冷却したエタノールを、最終濃度で70%になるように、混合溶液を-4℃に保ちながら添加攪拌した。この溶液は4℃で一夜放置した。生成した沈降物を遠心分離により集めた。

この分画は、更にセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーにより、精製を行い、280nmの吸光度を基に3分画した。このうち第1分画にリバーゼ活性が認められた。次いで、このリバーゼ活性を示す第1分画を集めて濃縮し、更に蒸留水に対する透析、凍結乾燥を行いリバーゼを得た(収量512mg)。

製は以下の様にして行った。卵の卵黄を採取し、その同量の生理食塩水を加え、室温で5分間振とうし、更に元の卵黄の2倍量のクロロホルムを加え、30分間の振とう、攪拌を行った。得られたエマルジョンを室温で30分間放置し、3000rpmで20分間遠心分離し、上清液を採取し、濾過滅菌して抗体分画を得た。抗体価の推移は、常法に従ってエンザイムイムノアッセイのうちのE1ISAにより追跡を行い、免疫前、2ヶ月目、3ヶ月目の抗体価を第3表に示した。その結果、菌体外に産生するリバーゼの方が、抗体価の上昇性が高く、3ヶ月後ではP. アクネス全菌体の約3.5倍の値を示した。

(以 白)

3-1. リバーゼの鶏に対する免疫

上記の方法で得られたP. アクネスが菌体外に産生するリバーゼを5mg/mlの濃度で生理食塩水に溶解した。次に完全フロイントアジュバントと1:1に混和し、完全なエマルジョンを調製した。これらのエマルジョンを約1.5ヶ月~2ヶ月令の鶏の鶏の左右の胸筋に0.5mlずつを筋肉注射した(1群10羽)。1ヶ月後に、同量の試料を再び筋肉注射した。

3-2. P. アクネス全菌体の鶏に対する免疫

対照として、予め70℃、3時間で熱処理したP. アクネス全菌体を2×10⁸コ/mlを上記免疫方法と同様に、別の実験群の鶏10羽に免疫した。1ヶ月後に、同量の試料を再び筋肉注射した。

4. 抗体価の測定

免疫操作した鶏が、免疫開始前1週間、2ヶ月目より1週間、3ヶ月目より1週間の期間に産生した卵を、それぞれ免疫前、2ヶ月目、3ヶ月目の卵として抗体価の測定に用いた。抗体分画の調

第 3 表

抗 原	抗体価 (× 10 ⁴)		
	免疫前	2ヶ月目	3ヶ月目
P. アクネス全菌体	< 1	6	21
リバーゼ	< 1	13	74

5. 卵黄抗体の調製

次に、免疫操作開始後3ヶ月目より1ヶ月間の期間に鶏が産生した卵の卵黄を採取し、「4. 抗体価の測定」の項で記述した通りに抗体分画を得た。

更に、この抗体分画を、硫酸アンモニウムの40%飽和濃度により沈降として回収し、生理食塩水に対して透析した後、再び硫酸アンモニウムの35%飽和濃度により沈降として回収し、蒸留水に対して48時間透析した後、凍結乾燥して精製された卵黄抗体を得た。得られた乾燥抗体は、硫酸アンモニウムによる沈降操作を行なう前の抗

特開平2-121908 (5)

体分兩の量になるように生理食塩水により再溶解し、これを原液としてE L I S Aにより抗体価を測定した。その結果を第4表に示す。

第4表

抗 原	卵 個 数	収 量 (g)	抗体価 ($\times 10^2$)
P. アクネス 全菌体	251	11.4	25
リパーゼ	264	12.3	112

実施例1～7、比較例1～4

(にきび用ローション)

にきび用ローション基剤に前記(卵黄抗体の調製)の項で得られたP. アクネスのリパーゼに対する卵黄抗体(実施例、以下抗リパーゼ抗体と略記する)、またはP. アクネスの全菌体に対する卵黄抗体(比較例、以下抗全菌抗体と略記する)をそれぞれ第5表に記載の如く配合した各試料を

調製し、試験に使用した。

(1) 組成 第5表

原 料 成 分	配 合 量 w t %
・各種卵黄抗体	第6表に記載
・エタノール	15
・ポリオキシエチレン硬化 ヒマシ油(可溶化剤)	1.0
・プロピレングリコール	10
・精製水	残量

(2) 調製法

第5表に示すエタノール、可溶化剤、プロピレングリコールを、必要に応じて加熱して精製水に溶解した後、50℃まで冷却した。次に、卵黄抗体を添加し、組成総量が100wt%となるように調製された残量の精製水を加えて均一に混合し、各にきび用ローションを調製した。

(3) 特性

実施例1～7、比較例1～4のにきび治療効果試験の結果を第6表に示す。

第6表に示す如く、実施例1～7の抗リパーゼ抗体を配合したにきび用ローションは、明らかに高いにきび治療効果が認められた。また、ヒト皮膚貼付試験における皮膚刺激性は認められなかった。一方、比較例1～4の抗全菌抗体を配合したにきび用ローションは、にきび治療効果が低く、且つヒト皮膚貼付試験における皮膚刺激性も高かった。

(以 下 略 白)

特開平2-121908 (6)

第 6 表

P. アクネス関連抗体			ヒト皮膚貼付試験 (25名中の評価点が±以上の人数)	にきび治療効果試験 (評価点)
		(配合量 w.t.%)		
実施例 1	抗リパーゼ抗体	0.0002	0	3.3 ± 1.0
実施例 2	抗リパーゼ抗体	0.001	0	3.5 ± 1.2
実施例 3	抗リパーゼ抗体	0.005	0	3.7 ± 1.3
実施例 4	抗リパーゼ抗体	0.01	0	3.8 ± 1.2
実施例 5	抗リパーゼ抗体	0.05	0	4.1 ± 1.3
実施例 6	抗リパーゼ抗体	0.1	0	4.3 ± 1.5
実施例 7	抗リパーゼ抗体	0.5	1	4.4 ± 1.4
比較例 1	抗全菌抗体	0.0001	0	1.6 ± 1.0
比較例 2	抗全菌抗体	0.001	2	2.0 ± 0.5
比較例 3	抗全菌抗体	0.01	4	2.1 ± 1.1
比較例 4	抗全菌抗体	0.1	6	1.8 ± 1.1

実施例 8 ~ 14、比較例 5 ~ 8

(にきび用スキนครリーム)

にきび用スキนครリーム基剤に本発明に係る卵黄抗体を第7表に記載の如く配合した各試料を調製し、試験に使用した。

(以 前 同 様)

(1) 組成

第 7 表

原 料 成 分	配 合 量 w.t. %
A・各種卵黄抗体	第8表に記載
B・ステアリン酸	7.0
・セタノール	3.0
・ミツロウ	2.0
・オリーブ油	1.5
・ポリオキシエチレンソル ビタンモノオレート	2.0
C・プロピレングリコール	5.0
・メチルパラベン	0.1
・精製水	残量

(以 前 同 様)

特開平2-121908 (7)

(四) 調製法

第7表のB及びC成分を、各々80℃に加熱溶解したもの混合した後、50℃まで冷却した。次に、卵黄抗体を添加し、攪拌しつつ冷却して30℃まで攪拌を続けた各にきび用スキンクリームを調製した。

(四) 特性

実施例8～14、比較例5～8のにきび治療効果試験の結果を第8表に示す。

第8表に示す如く、実施例8～14の抗リパーゼ抗体を配合したにきび用スキンクリームは、明らかに高いにきび治療効果が認められた。また、ヒト皮膚貼付試験における皮膚刺激性は認められなかった。一方、比較例5～8の抗全菌抗体を配合したにきび用スキンクリームは、にきび治療効果が低く、且つヒト皮膚貼付試験における皮膚刺激性も高かった。

(以 下 略)

第 8 表

P. アクネス関連抗体		(配合量w t %)	ヒト皮膚貼付試験 (25名中の評価点が±以上の人数)		にきび治療効果試験 (評価点)
実施例8	抗リパーゼ抗体	0.0005	0		3.2 ± 1.2
実施例9	抗リパーゼ抗体	0.002	0		3.3 ± 1.0
実施例10	抗リパーゼ抗体	0.005	0		3.5 ± 1.3
実施例11	抗リパーゼ抗体	0.02	0		3.9 ± 1.3
実施例12	抗リパーゼ抗体	0.05	0		4.1 ± 1.4
実施例13	抗リパーゼ抗体	0.2	0		4.3 ± 1.1
実施例14	抗リパーゼ抗体	0.5	1		4.5 ± 1.5
比較例5	抗全菌抗体	0.0001	1		1.5 ± 1.0
比較例6	抗全菌抗体	0.001	3		1.6 ± 0.9
比較例7	抗全菌抗体	0.01	5		1.9 ± 1.3
比較例8	抗全菌抗体	0.1	7		2.0 ± 1.1

特開平2-121908 (8)

(発明の効果)

本発明のにきび用化粧料は、皮膚刺激性が無く、
にきびの予防、治療に有効なる作用を有し、且つ、
長期間保存しても安定であって、その商品価値は
極めて高い。

特許出願人 鐘紡株式会社

